



MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

IT 00/16



3/8

REC'D 18 MAY 2000

WIPO

PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per INV. IND.

N. RM99A000069 DEL 29.01.1999

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, li 22 MAR. 2000

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

Giorgio Romanelli

A. RICHIEDENTE(I)
1) Denominazione LAMBIASE Alessandro codice L M B L S N 6 6 R 1 0 H 5 0 1 Z
Residenza ROMA (RM)
2) Denominazione _____ codice _____
Residenza _____
B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.
Cognome e nome BANCHETTI Marina ed altri Cod. fiscale _____
Denominazione studio di appartenenza Inq. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.
Via Piemonte n. 26 città ROMA Cap 00187 (prov) RM
C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario Inq. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.
Via Piemonte n. 26 città ROMA Cap 00187 (prov) RM
D. TITOLO classe proposta (sez./cl/sci) _____ gruppo/sottogruppo _____
"Uso del nerve growth factor nella terapia di patologie a carico dei tessuti intraoculari".-

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒ SE ISTANZA: DATA _____ N° PROTOCOLLO _____
cognome e nome _____

E INVENTORI DESIGNATI cognome e nome
1) LAMBIASE Alessandro
2) _____

3) _____
4) _____

SCIOGLIMENTO RISERVE

F. PRIORITÀ nazione o organizzazione tipo di priorità numero di domanda data di deposito Allegato S/R Data N. Protocollo
1) _____
2) _____
G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione _____

H. ANNOTAZIONI SPECIALI
NESSUNA

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es. riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
Doc. 1) 2 n. pag. 31
disegno
Doc. 2) _____ n. tav. _____
Lettera d'incarico
Doc. 4) _____ designazione inventore
Doc. 5) _____ documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6) _____ autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7) _____ nominativo completo del richiedente

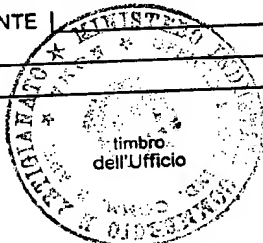
SCIOGLIMENTO RISERVE
Data _____ N° Protocollo _____
Confronta singole priorità
Data _____ N° Protocollo _____

8) attestati di versamento, totale lire CINQUECENTOSESSANTACINQUEMILA obbligatorio
COMPILATO IL 29/01/1999 FIRMA DEL(I) LAMBIASE Alessandro UN MANDATO _____
CONTINUA SI/NO NO RICHIEDENTE(I) Inq. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A. per se e per gli altri
DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI Marina Banchetti (N. d'iscr. 453)

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI RM 99A0000069 ROMA codice 58
VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA _____ Reg. A
L'anno millenovecento NOVANTANOVE il giorno VENTINOVE del mese di GENNAIO
Il(I) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE



L'UFFICIALE ROGANTE
L'Ufficiale Rogante
Silvia Attieri

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA

NUMERO BREVETTO

REG. A

PROSPETTO A

DATA DI DEPOSITO 20 / 01 / 1999

DATA DI RILASCIO

A. RICHIEDENTE(I)

1) Denominazione

2) Denominazione

RM 99A0000069

LAMBIASE Alessandro

D. TITOLO

"Uso del nerve growth factor nella terapia di patologie a carico dei tessuti

intraoculari".-

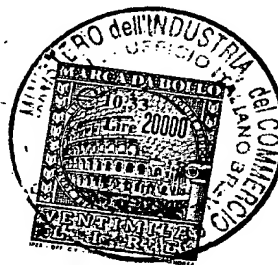
Classe proposta (sez./cl./scl/)

(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

Il nerve growth factor (NGF), sotto forma di preparato per somministrazione sulla superficie oculare, viene proposto per l'uso nella terapia e/o nella profilassi di patologie a carico dei tessuti intraoculari, con particolare riferimento ad affezioni interessanti la sclera, i corpi ciliari, il cristallino, la retina, il nervo ottico, il vitreo e la coroide. Applicato sotto forma di preparato oftalmico esterno, ad esempio in collirio o in goccia, il NGF è in grado di passare attraverso i tessuti oculari, ed è stato trovato che esso esercita un'azione terapeutica non solo in patologie retiniche e del nervo ottico, ma anche in affezioni che interessano le altre citate strutture interne dell'occhio.

M. DISEGNO



DESCRIZIONE R M 99 A 0 0 0 0 6 9

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione avente per titolo:

"Uso del nerve growth factor nella terapia di patologie a carico dei tessuti intraoculari"

a nome: Alessandro LAMBIASE

Inventore: Lo stesso Richiedente

La presente invenzione riguarda l'uso del nerve growth factor nella terapia di patologie a carico dei tessuti intraoculari. Più in particolare, l'invenzione concerne l'impiego della neurotrofina denominata nerve growth factor (NGF) per il trattamento terapeutico delle strutture interne dell'occhio, come sclera, corioide, corpi ciliari, cristallino, vitreo, retina e nervo ottico, mediante semplice somministrazione topica sulla superficie oculare, ad esempio in forma di collirio o di pomata oftalmica.

Come è noto, il nerve growth factor (NGF) è una molecola capostipite di una complessa famiglia di neurotrofine, ben conosciuta per la sua azione trofica, tropica e differenziativa sui neuroni colinergici del sistema nervoso centrale e sul sistema simpatico periferico. È prodotta in molti tessuti di mammiferi, uomo compreso, e viene rilasciata nel torrente circolatorio in quantità più elevate durante la crescita e la differenziazione del sistema nervoso. Studi biologici, biochimici e molecolari condotti su sistemi cellulari in vitro hanno messo in evidenza una elevatissima omologia tra il NGF murino e quello umano. Inoltre, nell'uomo come in altre specie animali il NGF è normalmente presente sia nel liquor cerebrospinale che nel torrente ematico a concentrazioni dell'or-

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

dine di 10-50 pg/ml, che aumentano in alcune patologie infiammatorie (malattie autoimmuni, allergiche, ecc.) e diminuiscono in altre (diabete).

Il NGF è stato scoperto dalla Prof. Rita Levi-Montalcini, nell'Istituto di Zoologia della Washington University di St. Louis (Levi-Montalcini R., Harvey Lect., 60:217, 1966) ed ha rappresentato un passo importante nello studio dei meccanismi di crescita e di differenziazione

della cellula nervosa, essendo in grado di influenzare lo sviluppo e il mantenimento delle funzioni biologiche e la rigenerazione dei neuroni.

Per la scoperta di questa molecola, per averne caratterizzato il ruolo biologico sia nel sistema nervoso periferico che in quello centrale, nel 1986 fu assegnato alla Prof. R. Levi-Montalcini il premio Nobel per la Medicina e Fisiologia.

Numerosi studi sperimentali in vitro ed in vivo hanno dimostrato l'importanza fisiopatologica del NGF nel prevenire il danno neuronale di natura chirurgica, chimica, meccanica ed ischemica, rendendolo il candidato ideale per l'impiego nella terapia di numerose patologie del sistema nervoso centrale e periferico (Hefti F., J. Neurobiol., 25:1418, 1994; J. Fricker, Lancet, 349:480, 1997). Infatti, già da qualche anno sono state effettuate prove cliniche su pazienti affetti dal morbo di Parkinson e dal morbo di Alzheimer, mediante somministrazione intracerebrale di NGF murino (si veda, ad es., Olson L et al., J. Neural Trans.: Parkinson's Disease and Dementia Section, 4: 79, 1992). I risultati di tali studi hanno confermato le osservazioni fatte su modelli animali ed hanno messo in evidenza l'assenza di possibili effetti collaterali in seguito alla somministrazione di NGF murino. Questa caratteristica è stata

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

confermata più recentemente per il NGF umano ricombinante (Petty B.G. et al., Annals of Neurology, 36:244-246, 1994).

Poiché fino dalla sua scoperta gli studi sulla caratterizzazione degli effetti biologici, biochimici, molecolari, preclinici e clinici del NGF sono stati condotti quasi esclusivamente con il NGF isolato dalle ghiandole sottomandibolari di roditori adulti, la più ampia quantità di dati

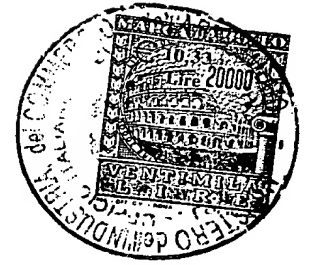
acquisiti riguarda attualmente il NGF murino. Le proprietà biochimiche di quest'ultimo sono state descritte, in particolare, in un lavoro che risale al 1968 (Levi-Montalcini R. e Angeletti P.U., Physiological Reviews, 48:534, 1968).

Il NGF contenuto nelle ghiandole salivari di topo è un complesso molecolare di 140 kdalton, con coefficiente di sedimentazione pari a 7S, costituito da tre subunità, α , β e γ , la seconda delle quali rappresenta la forma attiva vera e propria. Quest'ultima, detta β NGF, a coefficiente di sedimentazione pari a 2,5S, viene normalmente estratta e purificata seguendo tre metodologie non molto diverse tra di loro (Bocchini V., Angeletti P.U., Biochemistry, 64: 787-793, 1969; Varon S. et al., Methods in Neurochemistry, 203-229, 1972; Mobley W.C. et al., Molecular Brain Research, 387: 53-62, 1986).

Il β NGF ottenuto con tali metodiche è a sua volta un dimero di circa 13.000 dalton, costituito da due catene identiche di 118 amminoacidi. Ogni singola catena è stabilizzata da tre ponti disolfuro, mentre delle forze di legame non covalente garantiscono la formazione della struttura dimerica. Tale molecola, essendo molto stabile, risulta solubile pressoché in qualsiasi solvente sia acquoso che oleoso, conservando

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

inalterate le proprie caratteristiche biochimiche e l'attività biologica. Ulteriori dettagli sulla struttura e sulle proprietà fisiche e biochimiche della molecola sono riportati in Greene, L.A. e Shooter, E.M., Ann. Rev. Neurosci. 3:353, 1980.



Di recente, la struttura del β NGF è stata ulteriormente chiarita mediante un'analisi cristallografica. Questa ha rilevato la presenza di tre coppie antiparallele di filamenti, con struttura secondaria di tipo β , in grado di formare una superficie piana lungo la quale si associano le due catene per dare il dimero attivo. Su tali catene del β NGF si è evidenziata la presenza di quattro regioni "loop" in cui sono localizzati molti amminoacidi variabili ai quali, probabilmente, è legata la specificità di riconoscimento da parte del recettore.

L'effetto biologico del NGF è mediato da due recettori presenti sulla superficie delle relative cellule bersaglio. Esistono numerosi anticorpi che inibiscono selettivamente l'effetto biologico del NGF, la cui esistenza ha permesso e permette una accurata caratterizzazione e modulazione della sua azione, sia in sistemi cellulari che in vivo.

In tempi più recenti è stato possibile sintetizzare con tecniche di ingegneria genetica il NGF umano (Iwane, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 171:116, 1990), e sono anche divenute reperibili commercialmente piccole quantità di NGF umano. Tuttavia, da esperienze dirette si è riscontrato che l'attività biologica del NGF umano è molto bassa rispetto all'attività del NGF murino. Inoltre, è da tenere presente che la quasi totalità dei dati sull'uomo attualmente disponibili, sia in vitro che in vivo, sono stati condotti utilizzando il NGF murino, e che non

Ing. Parrano & Parrano
Roma s.p.a.

sono mai stati riscontrati effetti indesiderati ricollegabili all'origine murina della molecola.

Studi condotti a partire dagli anni '90 su modelli animali hanno suggerito un possibile coinvolgimento del NGF in patologie oculari. Escludendo alcune pubblicazioni brevettuali in cui il NGF non è oggetto di effettivi risultati sperimentali, ma viene genericamente citato assieme

ad altri fattori di crescita noti (nell'infondata assunzione che si tratti di un insieme omogeneo di molecole con caratteristiche ed azioni biologiche equivalenti), e ad eccezione della domanda di brevetto internazionale PCT pubblicata con il No. WO 98/48002, dello stesso attuale richiedente, in cui il NGF viene proposto per l'uso nella terapia di patologie della cornea e della congiuntiva (e di cui si tratterà in seguito), il materiale scientifico pubblicato in campo oftalmico riguarda esclusivamente l'impiego del NGF in affezioni retiniche e del nervo ottico.

In particolare, è stata riportata l'efficacia della somministrazione intraoculare di NGF, in modelli animali, nell'aumentare la sopravvivenza delle cellule gangliari retiniche in seguito ad ischemia acuta retinica (Siliprandi R. et al., *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 34:3232, 1993) e in seguito a transezione del nervo ottico (Carmignoto G. et al., *J. Neurosci.*, 9:1263, 1989). Più recentemente, la somministrazione per iniezione intravitreale o anche retrobulbare di NGF è risultata efficace in un modello di degenerazione retinica nel topo simile alla retinite pigmentosa umana (Lambiase A. e Aloe L., *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 234:S96-S100, 1996), e in un modello di danno retinico da ipertensione oculare nel coniglio (Lambiase A. et al., *Graefe's Arch. Clin. Exp.*

Ing. Barrano & Ranardo
Roma spa

Ophthalmol., 235:780-785, 1997).

I lavori sperimentali citati hanno dimostrato che la somministrazione locale di NGF è in grado di prevenire od almeno ritardare la morte delle cellule gangliari retiniche e dei fotorecettori durante le suddette patologie. Inoltre, in nessuno di tali studi sono stati evidenziati effetti collaterali sull'animale. Tuttavia, è da notare che in tutte le pubblicazioni

sopra citate il NGF viene somministrato ai tessuti oculari interni tramite iniezione intravitreale o retrobulbare.

La domanda di brevetto internazionale PCT pubblicata con il No. WO 98/48002, già menzionata, risulta essere finora l'unico documento in cui è descritto l'uso di NGF per applicazione oftalmica esterna, ad esempio in forma di collirio o di pomata. Il lavoro sperimentale ivi riportato dimostra come la somministrazione topica di NGF sia in grado di risolvere con successo le patologie della superficie oculare (cornea e congiuntiva) sia di natura congenita che acquisite e, in particolare, varie patologie su base distrofica o neurodistrofica per le quali non esistevano precedentemente validi trattamenti terapeutici. Presupposto per tale risultato innovativo era stata l'individuazione della presenza di NGF e del recettore ad alta affinità per il NGF (TrkA, tirosinchinasi A), con tecniche di immunoistochimica, nei tessuti corneali. Evidentemente, l'espressione del recettore ad alta affinità per il NGF è una condizione indispensabile perché questo fattore possa svolgere la propria azione terapeutica.

Nell'ambito degli studi che hanno portato alla presente invenzione, sempre utilizzando tecniche immunoistochimica e immunofluore-

Ing. Baranoff Baranoff
Roma s.p.a.

scenza (Lambiase A. et al., J. Allergy Clin. Immunol., 100:408-414, 1997), nonché tecniche biomolecolari di identificazione in situ dell'RNA messaggero per il nerve growth factor (Micera A. et al., Archives Italiennes de Biologie, 133:131-142, 1995), si è trovato che tutte le cellule della sclera, della capsula anteriore del cristallino, dell'epitelio dei corpi ciliari, le fibre del nervo ottico, le cellule gangliari retiniche, le cellule

dell'epitelio pigmentato retinico ed alcune cellule della coroide non solo esprimono il recettore ad alta affinità del NGF, ma sono anche in grado di produrre questa neurotrofina (dati non ancora pubblicati). Le implicazioni di questo risultato sperimentale sono molteplici: da un lato il NGF, rilasciato dalle cellule dei vari tessuti oculari, svolgerebbe un ruolo trofico e fisiopatologico in tutti i meccanismi riparativi oculari, e dall'altro numerose patologie di origine trofica, degenerativa o immunitaria riconoscerebbero come momento eziologico fondamentale il mancato rilascio del NGF.

Inoltre, dato che gli effetti che sono stati osservati dopo somministrazione di NGF esogeno avvengono a concentrazioni pressoché fisiologiche (nell'ordine di alcuni microgrammi) è ipotizzabile che un possibile meccanismo fisiopatogenetico in alcune affezioni oculari sia una riduzione dei livelli locali del NGF sotto la soglia in grado di garantire l'integrità dei tessuti. Tale ipotesi patogenetica trova conferma da alcuni dati presenti in letteratura sugli effetti della deprivazione di NGF, che induce sia in vitro che in vivo la morte di diverse popolazioni cellulari e l'esacerbazione di danni tissutali di natura chimica, fisica, infettiva o degenerativa (Aloe L., Int. J. Devl. Neuroscience, vol. 5(4), 1987; Lam-

Ing. Bariano & Bariano
Roma spa

biase A. e Aloe L., 1996, già cit.; Lambiase et al., Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., 1997, già cit.)

In tale quadro, benché i risultati di cui sopra consentano di ipotizzare un'attività terapeutica del NGF anche su strutture e tessuti oculari diversi da quelli per cui tale attività è già riportata in letteratura, e in modo specifico sulla sclera, i corpi ciliari, il cristallino, il vitreo e la

coroide, si pone tuttavia il problema di un'agevole somministrazione del principio attivo ai tessuti interessati. Diversamente dal caso considerato nella domanda di brevetto PCT pubbl. No. 98/48002, relativa a patologie della cornea e della congiuntiva, in questo caso si tratta, infatti, di tessuti interni al bulbo oculare.

La possibilità di somministrare un agente terapeutico oftalmico per via topica esterna, cioè in forma di collirio o pomata, rappresenta un notevole beneficio rispetto alle vie di somministrazione topica parenterale, per iniezione retrobulbare o intravitreale. Infatti, l'utilizzazione di queste ultime metodiche comporta il rischio di numerose complicanze, riportate in letteratura, tra cui la perforazione del bulbo oculare, sovrainfezioni, emorragie e lesioni di strutture anatomiche durante l'iniezione. Simili complicanze si possono verificare anche con una maggiore frequenza qualora si ipotizzi un trattamento di patologie croniche, e ciò potrebbe portare all'impossibilità di praticare la terapia per un'inversione del rapporto rischi/benefici.

È stato ora inaspettatamente trovato che somministrando il NGF sotto forma di collirio si ottiene un aumento dei livelli di tale neurotrofina in tutti i tessuti oculari, inclusi quelli interni al bulbo oculare. Co-



Ing. Barriano & Barriano
Roma s.p.a.

me sarà più dettagliatamente illustrato nel rapporto sperimentale riportato nel seguito, il passaggio della molecola del NGF dalla superficie oculare su cui veniva somministrato verso i tessuti interni dell'occhio è stato dimostrato impiegando sia una metodica autoradiografica (Levi-Montalcini, R. e Aloe L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7111-7115, 1985) che un dosaggio immunoenzimatico (Bracci-Laudiero, L. et al.

Neurosci. Lett. 147:9-12, 1992). Applicando quest'ultimo metodo su conigli trattati con instillazione congiuntivale di NGF in soluzione salina è stato rilevato, un'ora dopo la somministrazione, un aumento della concentrazione di NGF a livello di tutti i tessuti oculari esaminati. Tale aumento di concentrazione si riduce fino a tornare ai livelli basali dopo 6-8 ore. Ciò permette al NGF di esplicare la propria azione terapeutica anche nei tessuti non direttamente interessati da una sua somministrazione superficiale. Questo aspetto è innovativo non solo per tutte quelle patologie oftalmiche per cui l'efficacia terapeutica del NGF non era stata finora neanche ipotizzata, ma anche per le patologie retiniche e del nervo ottico, dove una potenziale azione del NGF era già stata riportata, ma non era possibile somministrare il farmaco in modo agevole e privo di pericoli e controindicazioni per il paziente.

Forma pertanto oggetto specifico della presente invenzione, secondo un suo primo aspetto, l'uso del nerve growth factor (NGF) per la produzione di un preparato oftalmico per somministrazione sulla superficie oculare, per la terapia e/o la profilassi di patologie a carico dei tessuti intraoculari. In modo specifico, detto preparato oftalmico a base di NGF è in forma di soluzione o di sospensione (collirio), di un-

Ing. Barzani G. Barzani
Roma s.p.a.

guento, di gel o di pomata con un veicolo oftalmico farmaceuticamente accettabile, tollerato dall'occhio e compatibile con il principio attivo. È anche possibile prevedere particolari forme di somministrazione oftalmica a rilascio protratto, come inserti oculari erodibili o sistemi "reservoir" a membrana polimerica da disporre nel sacco congiuntivale. In alternativa il NGF, o un preparato che lo contiene, può essere aggiunto ad un bendaggio locale con lente a contatto terapeutica.

Come già notato, detto preparato oftalmico è indicato per la terapia e/o la profilassi di patologie della sclera, dei corpi ciliari, del cristallino, della retina, del nervo ottico, del vitreo e della coroide, dette patologie potendo essere su base trofica, post-traumatica, infettiva, post-chirurgica, autoimmune, distrofica, degenerativa, post-infiammatoria e conseguente a trattamento laser. Come sarà confermato dai dati sperimentali riportati in seguito, la somministrazione topica esterna di NGF è risultata in grado, tra l'altro, di indurre una riparazione delle lesioni sclerali di origine traumatica o immunitaria, di causare un aumento della produzione di umore acqueo, ripristinando il tono oculare nelle patologie caratterizzate da ipotono ed evolventi in tisi bulbare, e di prevenire e ritardare la formazione e la progressione di opacità del cristallino (cataratta). In relazione alle patologie retiniche, la somministrazione di NGF per applicazione sulla superficie oculare induce un aumento dello spessore delle fibre nervose, una sopravvivenza delle cellule gangliari retiniche, dei fotorecettori e dell'epitelio pigmentato in condizioni di patologie degenerative, ischemiche, traumatiche e di danni da ipertono oculare. In relazione al nervo ottico, gli effetti ottenuti sono

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

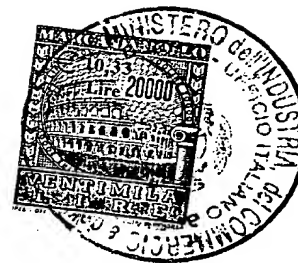
un miglioramento dei potenziali evocati visivi (PEV), del campo visivo e della sopravvivenza delle fibre nervose in caso di patologie traumatiche, ischemiche, pressorie e degenerative. Infine, a livello coroidale la somministrazione di NGF per applicazione oftalmica esterna causa una riduzione dei processi infiammatori a carico della coroide, e a livello del vitreo essa riduce il numero dei corpi mobili vitreali. È da notare che molti di questi disordini risultano a tutt'oggi di difficile approccio terapeutico o del tutto privi di un trattamento efficace.

La possibilità che il nerve growth factor manifestasse un'azione biologica sui tessuti interni del bulbo oculare in seguito a somministrazione locale esterna era difficilmente prevedibile soprattutto in considerazione del fatto che, come sopra evidenziato, il NGF è una molecola di notevoli dimensioni (26.800 dalton) con una struttura complessa. A affinché una molecola possa agire a livello dei tessuti oculari profondi è necessario che una volta instillata sulla superficie dell'occhio essa penetri attraverso il film lacrimale, la cornea, l'umore acqueo ed il vitreo, per potersi distribuire a tutti i tessuti. Nella pratica corrente non sono note molecole (in modo particolare, antibiotici o cortisonici) in grado di penetrare fino a livello del cristallino, del vitreo e della retina mantenendo una concentrazione terapeuticamente valida. Quanto precede rende conto del fatto che tutti gli studi noti riguardanti l'impiego di NGF in patologie oculari hanno adottato la via di somministrazione intraoculare.

In realtà, il NGF, pur presentando una struttura complessa e con elevato peso molecolare, ha gruppi strutturali sia di natura idrofila che idrofobica, potendo così passare le barriere anatomiche di natura

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

sia lipidica che idrofila. Inoltre, una sua caratteristica fondamentale è che una volta raggiunti gli organi bersaglio in concentrazioni anche minime, ma biologicamente attive, il NGF è in grado di stimolare una produzione endogena, da parte del tessuto, dello stesso NGF. La presenza di una componente di produzione endogena è chiaramente suggerita dai risultati della sperimentazione sul passaggio di NGF attraverso



so i tessuti, che verranno mostrati più avanti. Tali risultati mostrano anche che non è conservato un gradiente di concentrazione dalla superficie esterna dell'occhio verso i tessuti più profondi, come era ipotizzabile per una semplice meccanismo di diffusione attraverso i tessuti.

Ai fini della produzione del preparato secondo la presente invenzione, adatte metodiche di estrazione e purificazione del NGF sono riportate nella letteratura precedentemente citata. Per gli scopi sperimentali dell'invenzione si è adottata la tecnica di Bocchini e Angeletti, qui sinteticamente riportata. Vengono prelevate sterilmente le ghiandole sottomascellari di topi maschi adulti, e i tessuti vengono omogeneizzati, centrifugati e dializzati; quindi la sospensione viene fatta passare attraverso successive colonne di cellulosa, su cui rimane adsorbito il NGF. Il NGF viene quindi eluito dalla colonna mediante un tampone contenente cloruro di sodio 0,4 M. I campioni così ottenuti vengono letti allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 280 nm per identificare le frazioni contenenti il NGF. Queste ultime vengono dializzate ed il NGF così ottenuto viene liofilizzato sterilmente e conservato in frigorifero a -20 °C.

Un prodotto medicinale secondo l'invenzione adatto per som-

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

ministrato sulla superficie oculare contiene preferibilmente, da solo o in associazione con uno o più altri principi attivi, da 1 a 1000 µg/ml di NGF. Nel caso in cui il prodotto in questione sia una soluzione acquosa (collirio) la concentrazione può essere compresa, di preferenza, tra 10 e 500 µg/ml. Una formulazione specifica per collirio può contenere, ad esempio, 200 µg/ml di NGF in soluzione fisiologica allo 0,9 % di cloruro

di sodio, oppure in soluzione salina bilanciata (BSS®): in entrambi i casi, si tratta di una soluzione isotonica con la lacrima e quindi ben tollerata dall'occhio. Tuttavia, è anche possibile utilizzare soluzioni ipotoniche.

Alle soluzioni saline a base di NGF, da solo o in associazione con altre molecole biologicamente attive e/o coniugato con molecole carrier (come ad es. la transferrina) con lo scopo di favorire ulteriormente il passaggio attraverso la superficie oculare, possono essere aggiunti altri eccipienti scelti tra quelli correntemente usati in tecnica farmaceutica, ad esempio al fine di tamponare le soluzioni o sospensioni, per rendere stabile il principio attivo e ben tollerato il preparato. In modo specifico, i tamponi dovrebbero mantenere il pH nel campo 4-8. Ad esempio, la soluzione di cloruro di sodio di cui sopra può essere tamponata con uno qualsiasi dei tamponi ben noti nella tecnica farmaceutica per l'uso oftalmico, tra i quali il tampone fosfato, o il tampone trizma (tri-idrossimetil-amminometano), in maniera da avere un pH fisiologico, pari a 7,0-7,4, mantenendo al tempo stesso una osmolarità fisiologica (295-305 mOsm/l).

La tollerabilità può essere ancora migliorata mediante l'impiego di eccipienti quali il polisorbato 80 (o Tween 80), il destrano, il polieti-

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

lenglicole (ad es. PEG 400) e prodotti simili. La formulazione può contenere anche agenti viscosizzanti quali acido ialuronico, metilcellulosa, polivinilalcole, polivinilpirrolidone ed altri, con l'obiettivo di aumentare la biodisponibilità oculare, la stabilità e la tollerabilità del principio attivo. La biodisponibilità oculare del NGF può essere ulteriormente incrementata mediante l'impiego di sostanze che aumentano la permeazione corneale del farmaco quali, ad esempio, il dimetilsolfossido, i taurocolati, i fosfolipidi di membrana e vari tensioattivi di impiego oftalmico. Inoltre, si potrà aggiungere alla formulazione un agente conservante ad attività antimicrobica per prevenire contaminazioni.

Per prodotti da somministrare in sospensione si potrà impiegare un agente quale la carbossimetilcellulosa o altri prodotti simili, mentre nel caso in cui si voglia impiegare la formulazione in unguento, in gel o in pomata oftalmica il NGF potrà essere veicolato con eccipienti quali polietilenglicoli, poliacrilati, polietilenossidi, acidi ed alcoli grassi oppure lanolina, paraffina ed altri prodotti simili.

Come già notato, l'attività terapeutica del nerve growth factor nei confronti di tessuti oculari diversi da quelli superficiali (cornea e congiuntiva), dalla retina e dal nervo ottico non risulta descritta in precedenza, né per somministrazione mediante iniezione intraoculare né tanto meno per somministrazione di formulazioni in collirio o in pomata. Pertanto, costituisce un ulteriore oggetto specifico dell'invenzione l'uso del nerve growth factor (NGF) per la produzione di un preparato oftalmico per la terapia e/o la profilassi di patologie a carico dei tessuti intraoculari, ad esclusione delle patologie retiniche e del nervo ottico,

Ing. Barzani G. Barzani
Roma s.p.a.

qualsiasi sia la via di somministrazione prevista.

Anche in questo caso, la concentrazione di NGF nel preparato è preferibilmente nel campo tra 1 e 1000 µg/ml di NGF, e sono possibili tutte le scelte formulative ben note nella tecnica, e in particolare quelle indicate precedentemente con riferimento alle formulazioni oftalmiche per applicazione esterna.

Alcuni risultati sperimentali ottenuti nell'ambito della presente invenzione, inclusi i dati clinici relativi ad applicazioni terapeutiche sull'uomo, vengono riportati a titolo meramente esemplificativo nel seguito.

Studi sul passaggio di NGF attraverso i tessuti oculari

In una prima serie di prove per valutare il passaggio del NGF intraocularmente dalla superficie esterna su cui veniva somministrato è stata impiegata la metodica dell'autoradiografia, già citata, su un gruppo di sei conigli. A ciascuno degli animali è stata somministrata, per instillazione nel fornice congiuntivale, una goccia di collirio (50 µl) contenente 10 µg di NGF marcato con ^{125}I (concentrazione: 200 µg/ml).

È stato impiegato NGF murino purificato secondo la metodica precedentemente descritta, e successivamente coniugato con Na-I^{125} (Amersham Italia, IMS30, 1mCi) secondo la metodica della cloramina T (Lapack PA. Exp. Neurol. 124:1620, 1993). La quantità di NGF marcato è stata valutata per cromatografia utilizzando una colonna Sephadex G-25. La quantità di prodotto precipitabile marcato con ^{125}I era compresa tra il 90 e il 95%, dimostrando che la maggior parte del radioattivo era legato al NGF. L'attività specifica del NGF- I^{125} era compresa tra 1 e 1,5

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

Ci/μmol.

Due ore dopo la somministrazione del NGF marcato gli animali venivano sacrificati, e gli occhi enucleati e fissati in paraformaldeide al 4% per 48 ore. Quindi i campioni, dopo incubazione in saccarosio al 30% per 24 ore, venivano tagliati al criostato in sezioni di 15 μm di spessore e le sezioni venivano montate su vetrini gelatinati, immerse in

un'emulsione fotografica (Ilford K2) e incubate per 4 settimane a 4°C.

Le sezioni venivano quindi deidratate con etanolo, montate con DPX dopo trattamento con xilolo ed esaminate con un microscopio ottico Zeiss.

Questo esperimento dimostrava che il NGF marcato, una volta somministrato sulla superficie oculare, era in grado di penetrare all'interno dell'occhio, e di legarsi alle cellule dei vari tessuti oculari del segmento posteriore e del cristallino che esprimevano il recettore specifico.

In una seconda serie di prove sono stati valutati quantitativamente i livelli di NGF nei vari tessuti oculari dopo somministrazione di una goccia di NGF murino nel fornice congiuntivale, impiegando la tecnica immunoenzimatica già citata. Sono stati utilizzati un totale di 24 conigli, di cui 6 sono stati sacrificati immediatamente per la determinazione dei valori basali di concentrazione del NGF nei vari tessuti oculari. Gli altri animali sono stati sacrificati dopo 1 ora (6 conigli), 2 ore (6 conigli) e 8 ore (6 conigli) dalla somministrazione del collirio.

In tutti i casi gli occhi sono stati enucleati e dissezionati nei vari tessuti (cornea, sclera, acqueo, iride, cristallino, vitreo, retina, coroide, nervo ottico). Dopo essere stati pesati, i tessuti sono stati sonicati (uti-



Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

lizzando un Sonicatore B Braun) in una matrice proteica tamponata contenente inibitori delle proteasi (extraction buffer). L'omogenato così ottenuto è stato sottoposto a centrifugazione (10000 g per 20 minuti) e il sopranatante impiegato per la determinazione dei livelli di NGF mediante tecnica immunoenzimatica (ELISA). La tecnica adottata è estremamente sensibile e specifica per il NGF, ed è in grado di misurare

concentrazioni fino a 5 pg/ml. Come primo anticorpo è stato usato un policlonale di capra anti-NGF diluito in tampone carbonato 0,05 M a pH 9,6. Come controllo, per valutare il segnale aspecifico, sono state usate immunoglobuline purificate di capra.

Le soluzioni con l'anticorpo primario e con le immunoglobuline di controllo sono state distribuite in piastre di polistirene a 96 pozzetti in righe parallele. Le piastre sono state poi incubate per 12 ore a temperatura ambiente, e successivamente sono stati bloccati i siti aspecifici con una soluzione di tampone carbonato + BSA all'1%. Dopo il lavaggio delle piastre con una soluzione di Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, con NaCl 200 mM, 0,5% di gelatina e 0,1% di Triton X-100, i campioni e le soluzioni standard di NGF sono stati opportunamente diluiti con una soluzione di Tris-HCl 100 mM a pH 7,2, con NaCl 400 mM, EDTA 4 mM, PMSE 0,2 mM, cloruro di benzetonio 0,2 mM, benzimidina 2 mM, 40 U/ml di aprotinina, 0,05% di sodio azide, 2% di BSA e 0,5% di gelatina. Dopo aver distribuito in triplicato 50 µl/pozzetto di soluzioni standard di NGF ed i campioni, le piastre sono state incubate con l'anticorpo secondario: 4 mU/pozzetto di anti-β-NGF-galattosidasi (Boehringer Mannheim, Germania) per 2 ore a 37°C. Successivamente, dopo i lavaggi,

Ing. Barrano & Ranardo
Roma spa

sono stati distribuiti 100 µl/pozzetto di una soluzione di 4 mg di β-galattosil-rosso di clorofenolo (Boehringer Mannheim, Germania) per ml di una soluzione di HEPES 100 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ mM, 0,1% di sodio azide e 1% di BSA.

Dopo aver incubato il cromogeno per due ore a 37°C la densità ottica è stata misurata a 575 nm con un ELISA reader (Dynatech). I

valori delle concentrazioni degli standard di NGF e dei campioni sono stati calcolati dopo aver sottratto i valori di fondo (background) dovuti ai legami aspecifici. I dati sono stati espressi come pg/ml o come pg/gr di tessuto pesato a fresco. I risultati, sintetizzati nella seguente Tabella 1, dimostrano come vi sia un aumento dei livelli di NGF in tutti i tessuti intraoculari 1 ora dopo la somministrazione del collirio, come tali livelli rimangano elevati, anche se ridotti, 2 ore dopo, e come essi ritornino ai livelli basali 8 ore dopo.

TABELLA 1

Livelli di NGF nei vari tessuti oculari dopo somministrazione di NGF in collirio (pg di NGF/g di tessuto)

ORE	sclera	coroide	retina	nervo ottico	cristallino	vitreo
0	100 ± 50	960 ± 400	83 ± 50	83 ± 50	100 ± 15	10 ± 4
1	1414 ± 30	2800 ± 700	484 ± 70	1195 ± 180	200 ± 30	73 ± 12
2	694 ± 150	1813 ± 900	322 ± 100	342 ± 115	150 ± 20	20 ± 5
3	200 ± 100	100 ± 500	150 ± 70	130 ± 100	110 ± 20	10 ± 5

Studi dell'effetto del NGF in collirio nelle patologie sclerali

Attualmente non vi sono terapie mediche efficaci nell'indurre

Ing. Barrano & Ranardo
Roma s.p.a.

una riparazione di lesioni sclerali sia di natura traumatica che immunitaria o infettiva. In caso di patologie autoimmuni si assiste alla formazione di aree sclerali malaciche (scleromalacia) che tendono ad estendersi ed approfondirsi progressivamente fino alla possibile perforazione del bulbo. L'unico trattamento applicabile è quello chirurgico, consistente in un intervento di ricoprimento della zona lesa o malacica con sclera

umana conservata, oppure con altri materiali biocompatibili. Tuttavia, in caso di patologie immunitarie si assiste spesso a recidive della patologia sclerale.

Negli studi connessi all'invenzione è stato valutato l'effetto del NGF murino (2,5S) per somministrazione esterna in collirio, ad una concentrazione di 250 µg/ml diluito in soluzione salina bilanciata, in 4 casi di lesione sclerale, di cui 2 in seguito a trauma e 2 con scleromalacia per malattie autoimmuni (rispettivamente, artrite reumatoide, AR, e lupus eritematoso sistemico, LES). Il protocollo terapeutico consisteva nella instillazione di una-due gocce della preparazione con una frequenza giornaliera così suddivisa: ogni due ore per i primi due giorni, 6 volte al giorno fino al 2° giorno dopo la riparazione completa della sclera e 4 volte al giorno per i successivi 15 giorni. La terapia, una volta sospesa, dovrebbe essere immediatamente reinstaurata nel caso in cui si verificano i primi segni o sintomi di una recidiva della patologia sclerale.

Tutti i pazienti trattati hanno mostrato chiari segni di guarigione entro 2 settimane dall'inizio del trattamento con NGF. Nessuno di essi ha mostrato la comparsa di effetti collaterali locali o sistemici durante il

Ing. Barzani G. Barzani
Roma s.p.a.

trattamento o nel periodo successivo. I dati ottenuti sono riassunti nella seguente tabella.



Tabella 2

Effetto del trattamento con NGF in collirio nelle patologie sclerali

n. Paziente	Patologia	Età (anni) Sesso	Insorgenza	Estensione	Trattamento Con NGF	Esito	Follow up
1	Trauma perforante	35, F	4 giorni	4 mm	21 giorni	guarigione	8 mesi
2	Trauma perforante	42, M	5 giorni	6 mm	25 giorni	guarigione	6 mesi
3	Scleromalacia in AR	55, F	30 giorni	5 mm	20 giorni	guarigione	10 mesi
4	Scleromalacia in LES	42, F	25 giorni	4 mm	17 giorni	guarigione	8 mesi

Studi sull'effetto del NGF in collirio sulla produzione di umore acqueo

L'effetto della somministrazione topica di NGF in termini di produzione di umore acqueo è stato valutato in prima fase in un campione di 6 conigli normotesi. Utilizzando come metodica la tonografia mediante una sonda in camera anteriore, che è in grado di valutare modificazioni nella produzione di umore acqueo, si è rilevato che la somministrazione ogni 2 ore di NGF in collirio ad una concentrazione pari a circa 200 µg/ml, diluito in soluzione salina bilanciata, induce un aumento da 3 a 5 volte della produzione di umore acqueo. Tale aumento si mantiene per tutta la durata del trattamento.

Sulla base dei dati ottenuti sul modello animale sono stati trattati 3 pazienti con marcato ipotono oculare, in due casi conseguente ad intervento chirurgico (2 occhi) e nel terzo ad uveiti croniche recidivanti. Dati i valori endooculari estremamente ridotti (< 4mmHg), le condizioni stavano rapidamente progredendo verso la tisi del bulbo. Il protocollo

Ing. Barriano & Barriano
Roma spa

terapeutico consisteva nella instillazione di una-due gocce della preparazione di NGF (200 µg/ml) in soluzione salina bilanciata ogni due ore fino alla risoluzione del quadro clinico.

Tutti i pazienti trattati hanno mostrato chiari segni di guarigione entro 2 settimane dall'inizio del trattamento con NGF, con un ritorno a valori di pressione endoculare compresi tra 8 e 12 mmHg entro 4 settimane. Nessun paziente ha mostrato la comparsa di effetti collaterali locali o sistemici durante il trattamento o nel periodo successivo. I dati ottenuti sono riassunti nella tabella seguente.

Tabella 3
Effetto della somministrazione di NGF in collirio sulla produzione di umore acqueo

n. Paziente	Patologia	Età (anni) Sesso	Insorgenza	Trattamento Con NGF	Esito	Follow up
1	Vitrectomia	40, M	30 giorni	23 giorni	9 mmHg	7 mesi
2	Vitrectomia	53, F	25 giorni	21 giorni	10 mmHg	11 mesi
3	Uveite cronica	45, F	40 giorni	24 giorni	12 mmHg	10 mesi

Studi sull'effetto del NGF in collirio nella prevenzione della cataratta

Avendo accertato che le cellule della capsula del cristallino esprimono il recettore ad alta affinità per il NGF e che allo stesso tempo producono questa neurotrofina, si è investigato se una variazione dei livelli locali di NGF potesse essere alla base della formazione di opacità del cristallino (cataratta, un processo collegato in genere a fenomeni della senescenza, a diabete, trattamenti con steroidi, traumi o insulti fisici) e se fosse possibile prevenirne la formazione o la progressione mediante somministrazione topica di NGF.

Ing. Barriano G. Barriano
Roma s.p.a.

Per dimostrare l'attività del NGF è stato utilizzato in primo luogo un modello di formazione della cataratta in vitro. Nello studio, 18 cristallini di ratti adulti sono stati prelevati e posti in un terreno contenente xilosio. Quindi, 6 cristallini sono stati trattati aggiungendo al terreno di coltura quantità di NGF murino variabili tra 1 e 300 pg/ml, per 6 cristallini si è aggiunta una quantità di anticorpo anti-NGF compresa tra 500 e 1000 µg/ml, e gli ultimi 6 venivano lasciati come controllo. Dopo 48 ore in coltura era evidente che i 6 cristallini in cui era stato aggiunto l'anticorpo anti-NGF presentavano una cataratta pressoché totale, mentre i 6 cristallini di controllo presentavano una cataratta corticale con scarso interessamento del nucleo del cristallino. Gli ultimi 6, con aggiunta di NGF, presentavano soltanto rare tracce di opacità, la risposta migliore essendo ottenuta per una concentrazione di NGF nel mezzo di coltura di 200 pg/ml circa.

Per avere una conferma in vivo sull'attività del NGF nel prevenire l'insorgenza della cataratta, è stato utilizzato un modello animale di catarattogenesi mediante una dieta al 30% di glicerolo. Il 100% degli animali sottoposti a questo tipo di dieta sviluppa una cataratta entro il 44° giorno. Un gruppo di 10 animali è stato trattato con tre somministrazioni giornaliere di NGF in collirio ad una concentrazione di 200 µg/ml diluito in soluzione salina bilanciata, un altro gruppo di 10 animali è stato sottoposto a trattamento con anticorpi anti-NGF iniettati in camera anteriore e l'ultimo gruppo di animali è stato trattato con soluzione salina in gocce ed utilizzato come controllo.

Nel gruppo di animali trattati con anticorpo anti-NGF tutti i ratti

Ing. Barriano & Barriano
Roma 4/100

hanno sviluppato una cataratta entro il 30° giorno dall'inizio dell'esperimento; nel gruppo trattato con soluzione salina tutti gli animali hanno sviluppato una cataratta entro il 45° giorno, mentre nel gruppo di animali trattati con NGF solo 2 ratti (20%) hanno sviluppato una cataratta entro il 45° giorno.

Studi sull'effetto del NGF in collirio nelle patologie retiniche

Per valutare l'efficacia della somministrazione del NGF sulla superficie oculare nelle patologie retiniche sono stati ripetuti, in una prima fase, gli esperimenti su modelli animali già riportati in letteratura, utilizzando, oltre alle somministrazioni intravitreali o retrobulbari già descritte, anche la somministrazione del NGF in collirio, ogni 2 ore, alla concentrazione di 250 µg/ml in soluzione salina bilanciata. In tutti gli esperimenti, sia nel danno ischemico retinico, che nel danno da ipertono oculare, che nella retinite pigmentosa, il NGF somministrato in collirio ha dimostrato una efficacia pari alle altre vie di somministrazione.

Sulla base dei risultati ottenuti nell'animale sono stati trattati un totale di 7 pazienti, di cui 3 affetti da retinite pigmentosa, 1 affetto da foro maculare, 2 da maculopatia atrofica senile e 1 da retinopatia miopica. Il protocollo terapeutico consisteva nella instillazione di una-due gocce di NGF in collirio ad una concentrazione di 250 µg/ml in soluzione salina bilanciata ogni due ore per 4 settimane. I risultati del trattamento sono stati valutati in termini di esame obiettivo, elettroretinogramma (ERG), flusso ematico dell'arteria centrale retinica (valutato mediante OBF), sensibilità al contrasto, spessore dello strato delle fibre nervose (valutate con l'OCT), microperimetria e visus.

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

Dopo 4 settimane di trattamento tutti i parametri considerati sono risultati considerevolmente migliorati; in particolare si è avuto un miglioramento dell'ERG, del flusso ematico, della sensibilità al contrasto, un aumento delle fibre nervose, della microperimetria e un incremento del visus. I dati ottenuti sono riassunti nella seguente Tabella 4.

(segue tabella)



Ing. Barriano & Barriano
Roma s.p.a.

Tabella 4
Effetto del trattamento con NGF in collirio in patologie retiniche

n. Paziente	Patologia	Età (anni) Sesso	Tipo di Trattamento	Trattamento Con NGF	ERG ¹⁾	OBF ²⁾	Sensibilità al Contrasto	OCT ³⁾	Microperimetria	Visus
1	Retinite pigmentosa	35, F	Collirio	4 settimane	++	+	++	+	+	++
2	Retinite pigmentosa	40, F	Collirio	4 settimane	++	+/-	++	+	+	++
3	Retinite pigmentosa	32, M	Collirio	4 settimane	+++	++	++	+	++	++++
4	Foro maculare	55, F	Collirio	4 settimane	+	+	+	+++	+++	+++
5	Degenerazione maculare senile	70, F	Collirio	4 settimane	+	+/-	+	++	+++	+++
6	Degenerazione maculare senile	73, M	Collirio	4 settimane	+/-	+/-	+	++	++	+
7	Retinopatia miopica	26, M	Collirio	4 settimane	+	+	+	++	+++	+++

I valori sono espressi come miglioramento rispetto ai valori prima del trattamento con NGF: "-" = stabile o peggioramento; "+/-" = miglioramento < 10%; "+" = miglioramento tra l'11% e il 25%; "++" = miglioramento tra il 26% e il 50%; "+++" = miglioramento tra il 51% e il 75%; "++++" = miglioramento superiore al 75% = miglioramento tra l'11% e il 25%; "++" = miglioramento tra il 26% e il 50%; "+++" = miglioramento tra il 51% e il 75%; "++++" = miglioramento superiore al 75%

¹⁾ ERG = elettroretinogramma; ²⁾ OBF = flusso ematico dell'arteria centrale retinica; ³⁾ OCT = spessore dello strato di fibre nervose

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

Studi sull'effetto del NGF in collirio nelle patologie del nervo ottico

Per valutare l'efficacia della somministrazione del NGF sulla superficie oculare nelle patologie retiniche sono stati ripetuti, in una prima fase, gli esperimenti su modelli animali già riportati in letteratura, utilizzando, oltre alle somministrazioni intravitreali o retrobulbari già descritte, anche la somministrazione del NGF in collirio, ogni 2 ore, alla concentrazione

di 250 µg/ml in soluzione salina bilanciata. In tutti gli esperimenti di crash e sofferenza ischemica del nervo ottico il NGF somministrato in collirio ha dimostrato una efficacia pari alle altre vie di somministrazione.

Sulla base dei risultati ottenuti nell'animale sono stati trattati un totale di 7 pazienti, di cui 3 affetti da glaucoma a bassa pressione, 2 affetti da neurite retrobulbare idiopatica e 2 da neurite ottica ischemica. Il protocollo terapeutico consisteva nella instillazione di una-due gocce di NGF in collirio ad una concentrazione di 200 µg/ml in soluzione salina bilanciata ogni due ore per 4 settimane. I risultati del trattamento sono stati valutati in termini di esame obiettivo, potenziali evocati visivi (PEV), flusso ematico dell'arteria centrale retinica (valutato mediante OBF), sensibilità al contrasto, spessore dello strato delle fibre nervose (valutate con l'OCT), microperimetria, campo visivo e visus.

Dopo 4 settimane di trattamento tutti i parametri considerati sono risultati considerevolmente migliorati; in particolare si è avuto un miglioramento dei PEV, del flusso ematico, della sensibilità al contrasto, un aumento delle fibre nervose, della microperimetria, del campo visivo e un incremento del visus. I dati ottenuti sono riassunti nella seguente Tabella 5.

*Ing. Baranò & Baranò
Roma s.p.a.*

Tabella 5
Effetto del trattamento con NGF in collirio nelle patologie del nervo ottico

n. Paziente	Patologia	Età (anni) Sesso	Trattamento con NGF	PEV ¹⁾	OBF ²⁾	Sensibilità al Contrasto	OCT ³⁾	Microperimetria	Campo visivo	Visus
1	Glaucoma a pressione normale	45, F	4 settimane	+++	++	++	++	++	++	++
2	Glaucoma a pressione normale	37, F	4 settimane	++	+	+	++	++	+	+
3	Glaucoma a pressione normale	42, M	4 settimane	+	++	+	++	++	++	++
4	Neurite ottica idiopatica	41, M	4 settimane	++	++	+	+	++	+	++
5	Neurite ottica idiopatica	38, F	4 settimane	++	++	+	+/-	+	+/-	+
6	Neurite ottica ischemica	52, F	4 settimane	++	++	++	+	+/-	+	++
7	Neurite ottica ischemica	58, F	4 settimane	++	++	+	++	++	+	++

I valori sono espressi come miglioramento rispetto al valori prima del trattamento con NGF: "+" = stabile o peggioramento; "+/-" = miglioramento < 19%; "+" = miglioramento tra l'11% e il 25%; "++" = miglioramento tra il 26% e il 50%; "+++" = miglioramento tra il 51% e il 75%; "++++" = miglioramento superiore al 75%.

¹⁾ PEV = elettroretinogramma; ²⁾ OBF = flusso ematico dell'arteria centrale retinica; ³⁾ OCT = spessore dello strato di fibre nervose

Ing. Parrano & Parrano
Roma s.p.a.

Studi sull'effetto del NGF in collirio nelle patologie vitreali

Una soluzione salina bilanciata contenente 250 µg/ml di NGF è stata somministrata tre volte al giorno per 4 settimane in 4 pazienti affetti da miodesopsie dovute alla presenza di corpi mobili vitreali. Dopo 4 settimane di trattamento tutti e 4 i pazienti hanno riferito un miglioramento della sintomatologia.

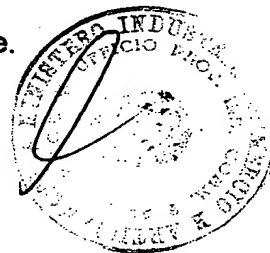
Studi sull'effetto del NGF in collirio nelle patologie coroidali

Per valutare l'effetto della somministrazione oftalmica esterna di NGF nelle patologie della coroide è stato utilizzato un modello animale di uveite autoimmune, ottenuta mediante somministrazione di antigene retinico S nei ratti. Un gruppo di animali è stato trattato ogni due ore con una goccia di NGF in collirio ad una concentrazione di 200 µg/ml diluito in soluzione salina bilanciata. Dopo 4 settimane di trattamento le lesioni presenti a livello uveo-retinico negli animali trattati con NGF in collirio sono state confrontate con quelle presenti negli animali trattati con soluzione salina. In tutti gli animali trattati con NGF era evidente una riduzione delle lesioni tissutali.

La presente invenzione è stata descritta con riferimento ad alcune sue forme di realizzazione specifiche, ma è da intendersi che variazioni o modifiche potranno essere ad essa apportate dagli esperti nel ramo senza per questo uscire dal relativo ambito di protezione.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Marina Banchetti
(N° d'iscr. 463)

Marina Banchetti



Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

RIVENDICAZIONI

1. Uso del nerve growth factor (NGF) per la produzione di un preparato oftalmico per somministrazione sulla superficie oculare, per la terapia e/o la profilassi di patologie a carico dei tessuti intraoculari.

2. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui detto preparato oftalmico è in forma di soluzione o di sospensione (collirio), di unguento,

di gel o di pomata con un veicolo oftalmico farmaceuticamente accettabile, oppure in forma di inserto oculare erodibile o di sistema "reservoir" a membrana polimerica da disporre nel sacco congiuntivale, oppure è aggiunto ad un bendaggio locale con lente a contatto terapeutica.

3. Uso secondo le rivendicazioni 1 o 2, in cui detto preparato oftalmico è indicato per la terapia e/o la profilassi di patologie della sclera, dei corpi ciliari, del cristallino, della retina, del nervo ottico, del vitreo e della coroide.

4. Uso secondo la rivendicazione 3, in cui dette patologie sono patologie su base trofica, post-traumatica, infettiva, post-chirurgica, autoimmune, distrofica, degenerativa, post-infiammatoria e conseguente a trattamento laser.

5. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni 1-4, in cui detto preparato oftalmico contiene da 1 a 1000 $\mu\text{g/ml}$ di NGF.

6. Uso secondo la rivendicazione 5, in cui detto preparato oftalmico è in forma di collirio e contiene da 10 a 500 $\mu\text{g/ml}$ di NGF.

7. Uso secondo la rivendicazione 6, in cui detto collirio contiene 200-250 $\mu\text{g/ml}$ di NGF.

8. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni 1-7, in cui il NGF è

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

in associazione, in detto preparato oftalmico, con uno o più altri principi attivi e/o è coniugato con una molecola carrier.

9. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti in cui detto NGF è di origine murina o umana, o è NGF umano ricombinante.

10. Uso del nerve growth factor (NGF) per la produzione di un preparato oftalmico per la terapia e/o la profilassi di patologie a carico dei tessuti intraoculari, ad esclusione delle patologie retiniche e del nervo ottico.

11. Uso secondo la rivendicazione 10, in cui detto preparato oftalmico è indicato per la terapia e/o la profilassi di patologie della sclera, dei corpi ciliari, del cristallino, del vitreo e della coroide.

12. Uso secondo la rivendicazione 11, in cui dette patologie sono patologie su base trofica, post-traumatica, infettiva, post-chirurgica, autoimmune, distrofica, degenerativa, post-infiammatoria e conseguente a trattamento laser.

13. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni 1-4, in cui detto preparato oftalmico contiene da 1 a 1000 µg/ml di NGF.

14. Uso del nerve growth factor nella terapia di patologie a carico dei tessuti intraoculari secondo le rivendicazioni 1-13, sostanzialmente come sopra descritto.

ROMA, 29 GEN. 1999

p.p. Alessandro LAMBIASE

ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Marina Bonchetti
(N° di iscr. 463)

Marina Bonchetti



*Ing. Barzano' & Zanardo
Roma S.p.A.*

MB

THIS PAGE BLANK (USPTO)